

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06269299 A**(43) Date of publication of application: **27.09.94**

(51) Int. Cl.

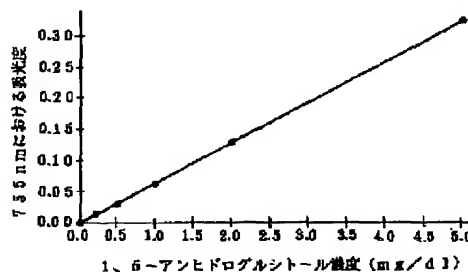
**C12Q 1/48****C12Q 1/26****C12Q 1/533**(21) Application number: **05060105**(22) Date of filing: **19.03.93**(71) Applicant: **KYOWA MEDEX CO LTD**(72) Inventor:  
**KOJIMA AYAKO**  
**AOYAMA NORIHITO**  
**MIKE AKIRA**(54) **DETERMINATION OF SUBSTANCE**

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&amp;Japio

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To accurately determine the component to be determined independent of the presence of glucose by reacting glucose in a specimen with glucose isomerase, fructokinase and 6-phosphofructokinase in the presence of ATP and subjecting to enzymatic reaction.

**CONSTITUTION:** In the determination of 1,5-anhydroglucitol in a specimen, glucose in the specimen is made to react with glucose isomerase, fructokinase and 6-phosphofructokinase in the presence of adenosine triphosphate (ATP) to convert glucose through fructose and fructose-6-phosphate to fructose-1,6- diphosphate. The objective determination component in the specimen (e.g. 1,5- anhydroglucitol) is treated with an oxidase and the consumption of oxygen, production of hydrogen peroxide or production of the reduced electron acceptor is determined to enable accurate determination of a substance such 1,5-anhydroglucitol independent of glucose present in the system.



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-269299

(43)公開日 平成6年(1994)9月27日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/48	Z 6807-4B		
	1/26	6807-4B		
	1/533	6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平5-60105

(22)出願日 平成5年(1993)3月19日

(71)出願人 000162478

協和メデックス株式会社

東京都中央区新川一丁目8番5号

(72)発明者 小嶋 彩子

静岡県駿東郡長泉町下長窪893-11

(72)発明者 青山 典仁

静岡県駿東郡長泉町納米里410-1

(72)発明者 三池 彰

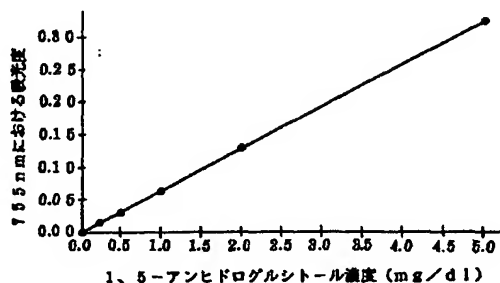
静岡県駿東郡長泉町納米里410-1

(54)【発明の名称】 物質の測定法

(57)【要約】

【構成】グルコースの共存する試料にアデノシン三リン酸の存在下、グルコースイソメラーゼ、フラクトキナーゼおよび6-ホスホフラクトキナーゼを作用させ、グルコースをフラクトース-1, 6-二リン酸に変換した後、試料中の定量すべき成分を酵素反応を利用して定量する方法。

【効果】本発明の定量法により、共存するグルコースの影響を受けずに物質を正確に定量することが出来る。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中のグルコースにアデノシン三リン酸の存在下、グルコースイソメラーゼ、フラクトキナーゼ、および6-ホスホフラクトキナーゼを作用させてグルコースをフラクトース-1, 6-二リン酸に変換した後、試料中の定量すべき成分を酵素反応を利用して定量する方法。

【請求項2】 試料中の定量すべき成分が1, 5-アンヒドログルシトールである請求項1記載の方法。

【請求項3】 1, 5-アンヒドログルシトールの定量が1, 5-アンヒドログルシトールに酸化酵素を作用させて生成する物質の変化を定量することによって行われる請求項2記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は試料中のグルコースを消去した後、試料中の特定の成分、例えば1, 5-アンヒドログルシトール等を酵素反応を利用して定量する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 生体試料中にはグルコースが存在し、成分を分析する際に試料中のグルコースが成分の測定結果に影響を与える場合がある。かかる場合目的成分の定量に先だってグルコースを分解あるいは当該定量に影響しない物質に変換した後定量が行われる。

【0003】 試料中のグルコースの消去方法としては、(i) イオン交換カラムクロマトグラフィーでグルコースを分離する方法（特開昭63-185307号公報、特開昭64-6756号公報）、(ii) ヘキソキナーゼ タイプIV（グルコース-6-ホスフォトランスフェラーゼ）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを用いてグルコースを酸化酵素の作用を受けない物質に変える方法（特開平1-320998号公報）および(iii) ヘキソキナーゼ タイプIV、ピルベートキナーゼを用い\*

\*てグルコースを酸化酵素の作用を受けない物質に変える方法（特開平2-104298号公報）が知られている。しかし(i)のカラムを用いる方法は操作が煩雑であり、また、(ii)および(iii)に示された方法は精度上、必ずしも満足できるものではない。

【0004】 1, 5-アンヒドログルシトールは糖尿病の診断マーカーとして知られている。1, 5-アンヒドログルシトールの定量法としては該物質に酸化酵素を作用させた後、酸素の消費量、過酸化水素の生成量または電子受容体の還元体の生成量を測定する方法が知られている（特公平3-24200号公報）。しかし、1, 5-アンヒドログルシトールを基質とする酸化酵素はいずれも基質特異性が弱く、試料中に共存するグルコースにも作用するため、多量のグルコースが共存する試料での該方法の使用には問題がある。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 試料中のグルコースを目的の成分の分析に影響を与えない物質に効率よく変換することによって目的の成分を正確に定量する方法の開発が求められている。

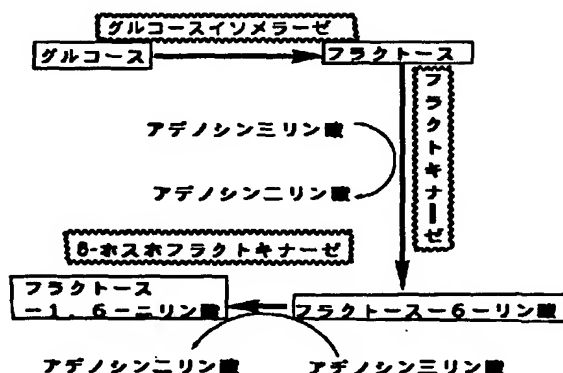
## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は試料中のグルコースにアデノシン三リン酸の存在下、グルコースイソメラーゼ、フラクトキナーゼおよび6-ホスホフラクトキナーゼを作用させてグルコースをフラクトース-1, 6-二リン酸に変換し、ついで目的の成分を酵素反応を利用して定量する方法に関する。

【0007】 この方法を1, 5-アンヒドログルシトールの定量に適用することによって1, 5-アンヒドログルシトールを正確に定量することができる。グルコース消去はグルコースを下記反応に従ってフラクトース-1, 6-二リン酸に変えることにより行われる。

## 【0008】

## 【化1】



【0009】 この反応においてグルコースをフラクトー 50 スに変換しただけではフラクトースが可逆反応によりグ

ルコースに戻るので、さらにフラクトースをフラクトース-6-リン酸を経由してフラクトース-1, 6-二リン酸に変換することによりグルコースへの変換反応が進行しないということが見出された。本発明はこの発見に基づいて完成された。

【0010】本発明は目的の成分の分析において、試料中に存在するグルコースが目的の分析を阻害する場合に適用することによって大きな効果を期待することができる。本発明は目的の成分を分析する際に用いられる酵素がグルコースにも作用する場合のみならず、目的の成分をグルコースを経由して定量する際にも適用できる。たとえばグルコースと類似構造を有する1, 5-アンヒドログルシトールの定量、あるいはグルコースを経由して定量するアミラーゼの定量等に適用すると効果が著しい。

【0011】本発明を実施するに際しては、グルコースが共存する試料にアデノシン三リン酸、グルコースイソメラーゼ、フラクトキナーゼおよび6-ホスホフラクトキナーゼを加え、好ましくはマグネシウム塩の存在下、必要によりSH化合物を加え、15-50℃で1-30分間、好ましくは3-10分間反応させる。

【0012】本反応においては、グルコースイソメラーゼ (EC. 5. 3. 1. 18) 0. 5-50 U/ml、フラクトキナーゼ (EC. 2. 7. 1. 4) を1-100 U/ml、6-ホスホフラクトキナーゼ [ホスホヘキソキナーゼ] (EC. 2. 7. 1. 11) 1-100 U/ml が用いられ、各酵素とも市販品が容易に入手可能である。

【0013】アデノシン三リン酸 (ATP) は0. 1-10 mg/ml の濃度で用いられる。ATPの代わりにピルベートキナーゼ (0. 5-50 U/ml) とホスホエノールピルベート (0. 1-10 mg/ml) 【特開平2-104298号公報】またはクレアチンキナーゼ (1-100 U/ml) とクレアチンホスフェート (0. 1-10 mg/ml) 等アデノシン三リン酸の生成系を用いて反応液中にATPを生成させることができる。

マグネシウム塩としては例えば、1 μM~100 mM濃度の、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム等があげられる。SH化合物としては、例えばメルカプトエタノール、システイン等があげられる。反応により生成したフラクトース-1, 6-二リン酸は安定で逆反応によりグルコースに変換されない。

【0014】該反応によりグルコースを消去した後、試料中の定量すべき成分の定量に必要な試薬を加えて、生成した成分を定量するか、反応前試料中に存在した成分の変化を定量することによって目的の成分を定量でき \*

試薬1      リン酸緩衝液 (PH7.5 )  
              塩化ナトリウム  
              グルコースイソメラーゼ  
              アデノシン三リン酸

\*る。

【0015】つぎに試料中の1, 5-アンヒドログルシトールの定量について説明する。1, 5-アンヒドログルシトールの定量はそれ自体公知の方法が何れも適用できる。例えば1, 5-アンヒドログルシトールに酸化酵素を作用させて生成する過酸化水素と色素体とをペルオキシダーゼの存在下に反応させ、生成する色素により呈色する反応液の可視部の吸収を測定することにより、1, 5-アンヒドログルシトールを定量することができる。

【0016】本反応において用いられる酸化酵素 (その使用量) としては、例えばソルボースオキシダーゼ (EC. 1. 1. 3. 11) (10-1000 U/ml)、ピラノースオキシダーゼ (EC. 1. 1. 3. 10) (1-100 U/ml) が用いられる。ペルオキシダーゼ (EC. 1. 11. 1. 7) は1-100 U/ml の濃度で用いられる。

【0017】色素体はペルオキシダーゼの存在下に酸化されて発色する化合物であれば何れも用いることができる。例えば、4-アミノアンチピリンまたは3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとフェノールもしくはその誘導体またはアニリンもしくはその誘導体のカップリング系が使用できる。好ましくは生成する色素の感度の高いものが良く、例えば2, 2'-アジノービス (3-エチルベンゾチアゾリノン-6-スルホン酸)、ビス [3-ビス (4-クロロフェニル) メチル-4-ジメチルアミノフェニル] アミン (以下BCMAと略す)

【特開昭59-182361号公報】、ビス [3-ビス (4-クロロフェニル) メチル-4-カルボキシエチルアミノフェニル] アミン 【特開昭59-182361号公報】、10-N-メチルカルバモイル-3, 7-ジメチルアミノ-10H-フェノチアジン (以下MCDPと略す) 【特開昭56-145352号公報】、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3, 7-ジメチルアミノ-10H-フェノチアジン (以下CCAPと略す)

【特開昭56-145352号公報】が使用できる。使用する色素体の量は過酸化水素と等モル量-1000倍モル量を用いる。

【0018】反応温度は15-50℃で、反応時間は3-30分間、好ましくは5-10分間である。以下に具体的な実施例を挙げる。

【0019】

【実施例】

実施例1. 1, 5-アンヒドログルシトールの測定に必要な以下のような組成の試薬1および2を調製した。

25 mM  
50 mM  
5 U/ml  
5 mg/ml

	フラクトキナーゼ	20 U/ml
	6-ホスホフラクトキナーゼ	20 U/ml
	塩化マグネシウム	4.9 mM
	ペルオキシダーゼ	10 U/ml
試薬2	リン酸緩衝液 (PH6.0)	200 mM
	フェノール	0.1 mg/ml
	ピラノースオキシダーゼ	100 U/ml
	BCMA	0.1 mg/ml

【0020】1, 5-アンヒドログルシトール5mg/dlの標準液を5段階(各5、2、1、0.5、0.2 5mg/dl)に希釈して作成した試料または精製水0.05mlに試薬1を2.25ml加え、37℃で10分間加温し、その後、試薬2を0.75ml添加してさらに5分間反応させ、755nmでの吸光度を測定した。得られた結果を図1に示した。

【0021】実施例2. 1, 5-アンヒドログルシトール2.55mg/dl(カラム法により定量)を含むヒト血清を試料として、実施例1の方法に従い試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量を測定したところ2.57mg/dlであった。

【0022】実施例3. 実施例2に用いた1, 5-アンヒドログルシトール2.55mg/dlを含むヒト血清を試料として、BCMAの代わりにMCDPを用いる以外は、実施例2と同様の方法に従い試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量を測定したところ2.56mg/dlであった。

【0023】実施例4. BCMAの代わりにCCAPを用いる以外は、実施例2の方法を繰り返した結果試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量は2.58mg/dlであった。

【0024】実施例5. アデノシン三リン酸を0.2mg/mlに減らし、クレアチンキナーゼ10U/mlおよびクレアチンホスフェート5mg/mlを加える以外は実施例2の方法を繰り返した結果、試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量は2.55mg/dlであった。

【0025】実施例6. 実施例5において、クレアチンキナーゼおよびクレアチンホスフェートの代わりにビルベートキナーゼ5U/mlおよびホスホエノールホスフェート1mg/mlを用いる以外は実施例2の方法を繰り返した結果、試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量は2.54mg/dlであった。

【0026】実施例7. 1, 5-アンヒドログルシトール5mg/dlおよびグルコース2000mg/dlの共存する試料において、実施例1の方法により試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量を測定したところ5

mg/dlであった。

【0027】実施例8. 1, 5-アンヒドログルシトール5mg/dlおよびグルコース2000mg/dlの共存する試料において、実施例5の方法により試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量を測定したところ5mg/dlであった。

【0028】比較例1. フラクトキナーゼおよび6-ホスホフラクトキナーゼを無添加にする以外は、実施例7と同様の測定を行ったところ、試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量は9.8mg/dlであった。

【0029】比較例2. 6-ホスホフラクトキナーゼを無添加にする以外は、実施例7と同様の測定を行ったところ、試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量は9.0mg/dlであった。

【0030】比較例3. 特開平1-320998号公報の方法に準じて、グルコースイソメラーゼ、フラクトキナーゼおよび6-ホスホフラクトキナーゼの代わりにヘキソキナーゼタイプIV 5U/ml、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ5U/ml、フェナジンメソサルフェイト(NADPからの水素受容体として)0.2mg/mlおよびNADP0.2mg/mlを用いる以外は、実施例7と同様の測定を行ったところ、試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量は6.5mg/dlであった。

【0031】比較例4. 特開平2-104298号公報の方法に準じて、グルコースイソメラーゼ、フラクトキナーゼおよび6-ホスホフラクトキナーゼの代わりにヘキソキナーゼ5U/ml、ビルベートキナーゼ3U/mlおよびホスホエノールビルビン酸0.1mg/mlを用いる以外は、実施例7と同様の測定を行ったところ、試料中の1, 5-アンヒドログルシトール量は9.5mg/dlであった。

【0032】以上、実施例7および8、比較例1~4で得られた1, 5-アンヒドログルシトール量の測定値および添加した1, 5-アンヒドログルシトール量と測定値との誤差を第1表に示す。

【0033】

【表1】

第1表

反応液中の添加物	実施例番号		比較例番号			
	7	8	1	2	3	4
グルコースイソメラーゼ	+	+	+	+	-	-
フラクトキナーゼ	+	+	-	+	-	-
6-ホスホフラクトキナーゼ	+	+	-	-	-	-
アデノシン三リン酸	+	+	+	+	+	+
クレアチンキナーゼ系	-	+	-	-	-	-
グルコース-6-リン酸	-	-	-	-	+	-
デヒドロゲナーゼ系	-	-	-	-	-	+
1, 5-アンヒドログルシトール 測定量 (mg/dl)	5.0	5.0	9.8	9.0	6.6	9.5
1, 5-アンヒドログルシトール 添加量に対する測定量の誤差 (mg/dl)	0	0	4.8	4.0	1.5	4.5

\* : 0.2 mg/dlのみ添加

+ : 添加

- : 非添加

【0034】第1表によれば、実施例7および8では、添加した1, 5-アンヒドログルシトール量 (5 mg/dl) を誤差無く定量できた。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、煩雑なカラム操作が不

用で簡便でありかつ正確な1, 5-アンヒドログルシトールの測定法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 1, 5-アンヒドログルシトールの検量線。

【図1】

